

利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦进展

于美, 唐华丽, 叶兴国

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 小麦籽粒营养丰富, 其面粉可制作成多种食品, 是全球超过三分之一人口的主食。随着病虫害加重、环境恶化(干旱、高温、盐碱)等生物和非生物逆境的影响, 全球小麦安全生产受到的威胁越来越大。为保障全球粮食安全供给和人民生活对优质产品的需要, 提高小麦产量和改进小麦品质仍将是重要的育种目标, 要求不断创新育种技术和种质资源。近10年来, 转基因和基因编辑等生物技术发展迅速, 逐步在小麦改良中发挥重要作用。建立了小麦高效遗传转化体系和基因编辑体系, 利用农杆菌转化模式基因型的转化效率50%以上, 利用CRISPR/Cas9编辑部分基因的编辑效率40%~70%, 利用再生相关基因基本克服了转基因和基因编辑研究中基因型的依赖性。通过转基因和基因编辑改良了小麦抗病性、抗逆性、特性品质、产量潜力和生长发育等多个性状, 创制了抗白粉病、条锈病、赤霉病、花叶病毒病、穗发芽, 以及耐旱、耐盐、低醇溶蛋白、高谷蛋白、高千粒重和雄性不育系、单倍体诱导系等小麦新材料, 丰富了小麦种质资源。本研究旨在综述小麦转基因和基因编辑的最新研究进展, 并探讨目前研究中存在的问题和可能的解决途径。

关键词: 小麦; 转基因; 基因编辑; 种质资源

Progresses on Wheat Improvement by Using Transgenic and Genome Editing Technologies

YU Mei, TANG Hua-li, YE Xing-guo

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Wheat grain, with rich nutrition and various end-uses in markets, provides diets in over one-third of the global human population. However, with the increasing influence of biological and abiotic stresses, such as threats of diseases and pests, environmental damages of drought, high temperature and salinization, the sustainability of global wheat production is under increasing threats. In order to ensure the global food security supply and demands for high quality products, the desirable increases on wheat production and quality require to the constantly developing of new breeding methods and germplasm resources used for wheat breeding. In the past decade, significant progress on plant biotechnologies such as transgenic study and genome editing has been achieved, and gradually applied in wheat genetic improvement. To date, the efficient systems for wheat genetic transformation and genome editing have been established, in which the transformation efficiency for the model genotypes mediated by *Agrobacterium* is higher than 50% and the editing efficiencies of some target genes via CRISPR/Cas9 reach to 40%-70%. The genotype independency in wheat transformation and genome editing has been overcome almost. Some of wheat traits including disease resistance, stress tolerance, quality feature, yield potential, and growth and development regulation have been modified by using transgenic and gene editing methodologies; many new wheat genetic stocks showing disease resistances to powdery mildew, rusts, scab and yellow mosaic virus, tolerances to pre-harvest sprouting, drought and salt, low gliadin content, high gluten content, male sterility and haploid induction ability were created by the requirement of wheat improvement. This

收稿日期: 2022-08-09 修回日期: 2022-08-21 网络出版日期: 2022-08-31

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220809001>

第一作者研究方向为小麦分子育种, E-mail: 2424154799@qq.com

通信作者: 叶兴国, 研究方向为小麦遗传育种, E-mail: yexingguo@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31971945)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31971945)

review aims to summarize the latest research progresses on transgene and genome editing in wheat, and to explore the current problems and possible solutions.

Key words: wheat; transgene; gene editing; germplasm resource

小麦是一种适应性强、分布广泛的粮食作物,籽粒中含有淀粉、蛋白质、脂肪、矿物质、钙、铁、硫胺素、核黄素、烟酸及维生素 A 等多种物质,营养价值较高,其独特的面筋特性可以用来制作多种面食,是全球 35%~40% 人口的主食。同时,小麦还是最重要的贸易和国际援助产品。但在以种植小麦为主的温带地区,病虫害流行和灾害性天气频发等生物和非生物胁迫因素造成每年数百万吨小麦产量的损失,需要利用新型生物技术培育抗病性和抗逆性强的优质、高产小麦品种^[1]。转基因和基因编辑分别是近 30 年和近 10 年来发展起来的生物育种技术,利用转基因技术培育了具有抗除草剂、抗虫等性状的转基因玉米、大豆、棉花和油菜新品种,自 1996 年以来在全球大面积种植,产生了巨大的经济效益和社会效益^[2];培育的黄金大米转基因水稻,富含维生素,营养价值高,对于解决非洲、亚洲一些国家和地区人口的饥饿问题将具有重要的应用价值。利用基因编辑技术培育的抗褐化苹果和马铃薯等品种已在部分国家获得了田间种植许可,显示出良好的商业化前景^[3]。小麦作为一种六倍体作物,基因组庞大,DNA 重复序列和基因拷贝数较多,组织培养再生性能较差,导致转基因研究和基因编辑研究落后于二倍体农作物。进入 21 世纪后,逐步建立了小麦高效遗传转化体系和基因编辑体系,转化效率和编辑效率显著提高,减弱了基因型的依赖性,对很多控制重要性状的基因进行了遗传修饰,创制了一批具有潜在育种价值和研究价值的新材料。

1 小麦遗传转化技术体系建立

1.1 小麦遗传转化主要方式

自 20 世纪末期开始,人们尝试利用多种转化方法和多种外植体转化小麦。转化方法主要包括基因枪、农杆菌、花粉管通道、超声波、离子束注入、激光微束穿刺和聚乙二醇(PEG, polyethylene glycol)等方法,其中,1993 年 Vasil 等^[4]首次利用基因枪转化小麦幼胚获得了转基因植株,1997 年 Cheng 等^[5]首次利用农杆菌转化小麦幼胚获得转基因植株,这 2 例报道是小麦转基因技术研究的经典事件。虽然利用花粉管通道、离子束注入、激光微束穿刺、农杆菌

植株水平侵染或籽粒水平侵染等方法也获得了转基因植株,但对转基因植株检测的证据不够充足,试验的可重复性比较差,已经被逐步放弃。已成功利用基因枪和农杆菌转化小麦的外植体包括幼胚、成熟胚、花药愈伤组织和幼穗等,幼胚的再生能力最强,适宜的取样时期比较容易掌握,因此,目前的转基因小麦研究广泛采用幼胚作为受体组织。与幼胚相比,小麦成熟胚取材方便,转化操作不受种植条件和生长时期的限制,所以,利用农杆菌或基因枪转化小麦成熟胚一直受到研究者的关注,并获得了转基因植株^[6]。

总体而言,农杆菌介导法相比基因枪介导法具有一些独特的优势,如操作简单、成本较低、目标基因整合的拷贝数较少、T-DNA 插入位点能够明确、生物安全性较高等。而基因枪介导法可以转化细胞器,并能够将 RNA、蛋白质、纳米颗粒、染料和 DNA 复合物输送到细胞中。两种转化方法都存在基因型的依赖性,但农杆菌转化对基因型的依赖性更强,因为不同小麦品种具有不同的再生能力和对农杆菌感染的反应能力^[7]。在优化农杆菌和基因枪转化体系的同时,筛选出多个相对容易转化的小麦基因型,如 Bobwhite、Veery、新春 9 号、CB037、科农 199 等^[8-10]。近 10 年来,小麦转基因研究绝大部分利用农杆菌转化方法进行,转化效率 3%~20%,基因枪主要用于亚细胞定位和瞬间表达等研究。例如, Hayta 等^[11]基于 Fielder 建立和优化了农杆菌转化小麦幼胚可重复性的转化体系,转化效率达 25%,认为健康生长的供体植株(生长期不施用农药)、适宜发育时期的幼胚、离心预处理、Gelzan 凝固剂类型、较长的共培养时间(3 d)、*hpt* 筛选标记、*actin* 启动子等是提高转化效率的主要因素。

1.2 PureWheat 高效转化技术和应用

进入 21 世纪后,日本烟草公司利用春小麦品种 Fielder 幼胚建立了农杆菌介导的 PureWheat 高效转化体系^[12],即利用农杆菌转化经离心处理的小麦幼胚(大小 2.5~3.0 mm,室温下侵染 5~10 min),依次经过共培养(23 °C, 黑暗)、恢复培养(25 °C, 黑暗)、筛选培养(培养基中添加 5~10 mg/L 草丁磷或 25~40 mg/L 潮霉素, 25 °C, 黑暗)、分化培养(培养基中添加 5 mg/L 草丁磷或 25 mg/L 潮霉素, 25 °C, 光照)和壮苗培养

(培养基中添加 5 mg/L 草丁磷或 25 mg/L 潮霉素, 25 °C, 光照), 获得小麦转基因植株, 转化效率 50.0%~90.0%。保证母体植株在温和的环境条件下生长, 采用较大体积且完整无伤口的幼胚, 侵染前对幼胚进行离心处理, 共培养后及时切除幼胚的胚轴, 愈伤组织诱导阶段变化培养基中生长素组合和浓度等, 这些因素是利用 PureWheat 技术获得转基因小麦植株的关键环节^[12]。

利用 PureWheat 技术, Richardson 等^[10]转化了源自澳大利亚、美国、加拿大和墨西哥的几个普通小麦品种和硬粒小麦品种, 普通小麦品种 *Gladius*、*Westonia* 和 *Fielder* 转化效率 25.0%~32.0%, *Janz*、*Pastor*、*Sunstate*、*Bobwhite26*、*Frame*、*Gascoigne* 和 *Sunvale* 转化效率 0~9.0%; 硬粒小麦品种 *Stewart* 和 *Kronos* 转化效率 26.0%~51.0%。通过对 PureWheat 技术的引进和细微改进, 本实验室转化 *Fielder* 和 *CB037* 的转化效率分别达 53.0% 和 37.7%, 并成功转化了另外 15 个商业小麦品种, 转化效率 2.7%~37.7%, 显著拓展了基因型的范围^[9]。由于利用 PureWheat 技术可以大幅度提高 *Fielder*、*Gladius* 等模式易转化小麦基因型的转化效率, 能够大量获得候选转基因植株, 所以共培养后在不添加筛选剂的培养基上诱导愈伤组织和再生植株, 就可以获得无筛选标记的转基因植株^[10]。

1.3 利用再生相关基因克服基因型依赖性

在模式植物中的研究表明, 植物生长发育调节因子 *SERK* (Somatic embryogenesis receptor-like kinase)、*WUS* (*Wuschel*)、*LEC1* (*Leafy cotyledon1*)、*NiR* (*Nitrite reductase*) 和 *AGP* (*Arabinogalactan-protein*) 等可以促进体细胞胚胎发生和再生芽分化, 提高植株再生效率^[13]。尤其是利用玉米来源的转录因子基因 *BBM* (*Baby boom*) 和 *WUS2* (*Wuschel2*), 不但显著提高了玉米的转化效率, 而且显著提高了水稻、甘蔗和高粱等植物的转化效率^[14-15]。但是, *BBM* 和 *WUS2* 在细胞中的表达影响愈伤组织分化和根系生长, T-DNA 整合完成后需要利用诱导型启动子介导的特殊处理和 *Cre/LoxP* 系统及时从愈伤组织的基因组中移除 *BBM* 和 *WUS2* 基因, 操作过程比较复杂。相对于模式植物, 小麦属于再生比较困难的物种, 再生和转化的基因型依赖性比较强, 绝大多数优良品种不易获得转基因植株, 需要利用再生基因提高转化效率。

生长调节因子 (GRF, growth regulation factor) 蛋白具有两个高度保守的结构域 QLQ 和 WRC, 分别

介导蛋白质间以及与 DNA 的相互作用, GRF 在植物体内可与辅助因子 (GIF, GRF-interacting factor) 互作。Debernardi 等^[16]在小麦中鉴定到了与水稻 *GRF4* 同源的蛋白, 同时选择与拟南芥和水稻 *GIF1* 亲缘关系最近的 1 个 *GIF1*, 构建 *GRF4-GIF1* 融合基因表达载体转化不同硬粒小麦品种, 转化效率 9%~96% (平均 65%), 并加快了转化后的植株再生进程, 使硬粒小麦的转化时间从 91 d 缩短到 56 d。进一步发现, 利用 *GRF4* 和 *GIF1* 显著增加了再生植株的数量, 转化后的幼胚组织在只添加细胞分裂素、不添加筛选剂的培养基上培养就可以获得无筛选标记转基因植株^[16]。另外发现, 过表达 *GRF4-GIF1* 嵌合蛋白不仅能够显著提高硬粒小麦的转化效率, 还提高了柑橘、葡萄和水稻等植物的转化效率^[16]。

中国农业科学院作物科学研究所转基因中心小麦实验室经过多年探索, 在小麦中鉴定到了 1 个与植株再生相关的转录因子基因 *TaWOX5* (*Wuschel related homeobox 5*), 通过将该基因与 PureWheat 技术结合用于小麦转化, 几乎提高了所有参试小麦品种的转化效率, 不但显著提高了 *Fielder*、*CB037* 和科农 199 等易再生小麦基因型的转化效率, 而且提高了济麦 22、郑麦 7698、苏麦 3 号和中国春等多个难再生小麦推广品种或重要种质资源的转化效率, 尤其成功转化了宁春 4 号、矮抗 58、西农 979 等难转化的明星小麦品种, 转化效率提高了 2~10 倍。*TaWOX5* 基因的应用基本克服了小麦未成熟胚转化中基因型依赖性的问题^[17]。另外发现, *TaWOX5* 对小麦愈伤组织分化和再生植株根系生长没有明显影响, 其宽叶表型有利于转基因植株的直观识别, 以及无筛选标记转基因植株的快速鉴定^[17]。共表达 *TaWOX5* 和可视化标记时的瞬间转化效率与稳定转化效率一致, 表明在利用 *TaWOX5* 时小麦的转化效率主要取决于农杆菌侵染效率^[17]。进一步发现, 利用 *TaWOX5* 基因也能提高黑麦、硬粒小麦、六倍体小黑麦和玉米的转化效率, 首次获得了栽培一粒小麦转基因植株, 并建立了栽培一粒小麦的转化体系^[17]。

2 小麦基因编辑技术体系建立

随着基因组测序技术的发展, 克隆植物基因已经变得容易, 利用基因编辑技术可实现对重要基因的精准调控, 明确其功能并创造有应用价值的种质资源。基因编辑技术经历了 3 个发展阶段, 包括锌指核酸酶 (ZFNs, zinc finger nucleases)、类转录激活因子效应物核酸酶 (TALENs, transcription-like activator

effector nucleases) 和 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats CRISPR associated nuclease 9), 编辑效率不断提高, 脱靶率逐步降低, 可操作性逐步简化。

2.1 ZFN 编辑技术

ZFN 是第一代基因编辑技术, 由 1 个锌指蛋白的 DNA 结合域和 1 个核酸内切酶 FOKI 的裂解区域融合而成。DNA 复合结构域由多个锌指蛋白串联而成, 每个锌指蛋白可以识别 3 个连续的碱基。多个锌指蛋白串联后, 可以识别 9~18 bp 的特定核苷酸序列。ForkI 核酸酶仅在二聚体状态下有活性, 在切割双链 DNA 产生双链断裂 (DSB, double strand break) 时需要在靶点的两侧设计 1 个 ZFN。当两个 ZFN 结合时, ForkI 可以形成二聚体, 以切断靶点的 DNA 序列^[18]。目前, 该技术已成功应用于玉米、水稻、大豆、油菜、拟南芥和烟草等。在小麦中, Ran 等^[19]首次应用 ZFN 介导的非同源末端连接 (NHEJ, non-homologous end joining) 定向编辑小麦中的乙酰羟酸合酶编码序列, 通过特定单个氨基酸的改变赋予了小麦对咪唑啉酮除草剂的抗性。ZFN 载体的设计和构建难度大、耗时长、成本高, 该技术在作物基因编辑中的应用受到限制。

2.2 TALEN 编辑技术

TALENs 是第二代基因编辑技术, 在结构上类似于 ZFN, 由 FokI 核酸酶域和 1 个可定制的 DNA 结合域融合而成^[20-21]。可定制的 DNA 结合域是 TALEs 衍生物, 包含高度保守的重复序列, 一系列 33~35 个高度保守的氨基酸重复序列帮助 TALEs 与 DNA 结合。TALEN 的 N 端和 C 端拥有额外的 TALE 衍生结构域, 用于介导 DNA 附着。FokI 核酸酶对目标 DNA 序列进行切割, 然后细胞通过 NHEJ 方式对切割后的 DNA 进行修复, 导致 DSB 区域内核苷酸的插入或缺失, 最终以移码突变的形式结束^[21]。与 ZFN 相比, TALEN 的载体设计相对灵活, 构建相对简单, 精准性较高, 脱靶率相对较低, 但利用 TALEN 不能同时编辑多个基因。Wang 等^[22]利用 TALEN 技术首次在小麦中诱导了 3 个 *TaMLO* 同源基因的突变, 赋予了编辑植株对白粉病的遗传广谱抗性。

2.3 CRISPR/Cas9 编辑技术

CRISPR/Cas9 是第三代基因编辑技术, 由高度保守的重复序列和完全不同的间隔序列交替排列组成, Cas9 蛋白和单链引导 RNA (sgRNA) 结合形成嵌合蛋白体, 在 sgRNA 的协助下 Cas9 蛋白能够

识别相对简单的前间隔序列临近基序 (PAM, protospacer adjacent motif) 5'-NGG-3', 并对与 sgRNA 互补的双链 DNA 进行切割, 断裂的 DNA 链再通过非同源末端连接或同源重组的方式进行修复, 从而实现目的基因的编辑。进一步在 CRISPR/Cas9 的基础上开发了新的基因编辑技术, 如 Cpf1 (CRISPR from *prevotella* and *francisella* 1), 代替 Cas9 的功能。CRISPR/Cas9 系统的载体构建比较简单, 编辑效率高, 可同时对植物中的多个基因进行编辑, 并且脱靶率较低, 因此是小麦中应用最成功的编辑技术。例如, 首次开发的 CRISPR/Cas9 系统在小麦原生质体中验证了序列特异性 sgRNAs^[23], 利用农杆菌介导的 CRISPR/Cas9 系统侵染小麦幼胚材料, 分别对 3 个基因 (*Pinb*、*Waxy* 和 *DAl*) 进行编辑, 突变效率 6.8%~54.2%, 未检测到脱靶突变^[24]。

2.4 小麦基因编辑体系比较和优化

中国农业科学院作物科学研究所转基因中心小麦实验室对小麦中 CRISPR 的编辑体系进行了优化, 比较了 3 种启动子 (*OsU6*、*TaU3* 和 *TaU6*) 调控目标基因 sgRNA、3 种 CRISPR 体系 (SpCas9、Cpf1 和 xCas9) 和不同靶点数对目标基因的编辑效率, 发现 *OsU6*、*TaU3* 和 *TaU6* 编辑效率分别为 21.6%、61.6% 和 36.0%; 单靶点的编辑效率为 45.7%~64.6%, 双靶点的编辑效率为 70.1%, 并在两个靶点间出现了 DNA 片段删除现象, 删除效率为 37.2%; 虽然利用 CRISPR/Cpf1 和 CRISPR/xCas9 可以获得编辑植株, 但与 CRISPR/SpCas9 系统相比, 它们对靶标基因的编辑效率非常低, 只有 3.1% 和 1.5%。表明在利用 CRISPR/SpCas9 编辑系统的前提下, 设计 *TaU3* 启动子靶向目标基因的多个串联 sgRNA, 可以显著提高对小麦中目标基因的编辑效率^[25]。

在另外的研究中, 比较了 Cas9 与两个 Cpf1 基因 *AsCpf1* 和 *LbCpf1* 在小麦中的编辑效率, 发现 *LbCpf1* 比 *AsCpf1* 和 Cas9 对靶基因 *TAPDS* 的编辑效率更高, Cas9 比 *AsCpf1* 和 *LbCpf1* 诱导的脱靶突变更多, 认为 CRISPR/*LbCpf1* 是小麦等多倍体植物有效的基因组编辑工具^[26]。

3 利用转基因技术改良小麦

3.1 抗病性改良

白粉病、锈病、赤霉病、黄矮病 (BYDV, barley yellow dwarf virus)、黄化叶病毒病 (WYMV, wheat yellow mosaic virus)、全蚀病和纹枯病等是小麦生长期间的主要病害, 在小麦产区经常发生, 减产严

重。如白粉病每年在中国的发病面积60万公顷左右,普通年份减产10%~20%,流行年份减产40%以上。白粉病和赤霉病不仅降低小麦籽粒产量,还降低营养品质和加工品质。小麦中相应的抗病资源逐渐枯竭或缺乏抗源,需要利用转基因技术和基因编辑技术创制抗病新种质,提高小麦的抗病性。将多聚半乳糖醛酸酶抑制剂蛋白酶(PGIP, polygalacturonase-inhibiting protein)编码基因转入小麦,增强了转基因小麦对根腐病的抗性^[27]。将小麦梭条花叶病毒复制酶基因*Nia*发卡结构和*Nib8*反向序列的RNAi载体转入小麦,转基因植株对该病毒表现免疫^[28-29]。*vsRNA1*在WYMV侵染前期高表达,并抑制*Nib8*基因表达,将*vsRNA1*基因转入小麦获得的转基因株系(L12与L17)对WYMV表现高抗,表明*vsRNA1*参与了小麦对WYMV的抗病性^[30]。

在小麦中表达来自簇毛麦的*ERF1-V*基因增强了小麦对白粉病的抗性^[31],过表达小麦自身的*TaJAZ1*基因通过促进活性氧的积累提高了小麦白粉病的抗性^[32],转大麦*chi26*基因的小麦植株同时抗锈病和白粉病^[33],过表达*Yr10*的转基因小麦植株表现出对条锈病的抗性^[34]。将蒺藜苜蓿质外体靶向抗真菌防御素*MtDEF4.2*的嵌合基因转入小麦,发现*MtDEF4.2*表达不影响小麦根系与有益菌真菌的共生关系,对叶锈病表现抗性^[35]。目前,已鉴定的秆锈病全生育期抗性基因*Sr22*、*Sr35*、*Sr45*和*Sr50*,以及成株期抗性基因*Sr55*,它们的抗病性比较稳定、持久,但是只能提供部分抗病性,在病原菌流行严重的期间不足以保护小麦正常生长,将这5个抗秆锈病基因聚合转入小麦,发现转基因小麦对锈菌具有广谱抗性^[36]。最近,Wang等^[37]从小麦与条锈菌互作入手,利用BSMV-VIGS技术对小麦与条锈菌互作中的差异表达激酶基因进行抗锈性分析,鉴定到编码胞质类受体激酶基因*TaPsIPK1*负调控小麦抗锈性。进一步创制了*TaPsIPK1*RNAi及过表达转基因小麦材料,发现RNAi稳定沉默降低小麦感病性,过表达则增强小麦对条锈菌的感病性。

将*TaPIMP1*、*TaERF1*和*TaSTT3b-2B*等抗病相关基因转入小麦,创制了抗纹枯病的转基因小麦新种质^[38-40]。将*FsTRI101*、*RsAFP2*等基因转入小麦,获得的转基因小麦对赤霉病表现一定抗性^[41-42]。在中度感赤霉病的品种中过表达*His^R*的1个等位基因,转基因植株获得了对赤霉病较高的抗性^[43]。将从二倍体长偃麦草中克隆的抗赤霉病基因*Fhb7*(编码谷胱甘肽S-转移酶,GST)转入感病小麦,转基因

植株抗赤霉病和冠腐病,验证了*Fhb7*的功能,认为二倍体长偃麦草中的*Fhb7*基因源自真菌的水平转移^[44]。

3.2 抗逆性改良

随着全球气温升高和工业化发展的加快,干旱和盐碱等非生物胁迫对小麦生产的危害越来越重,利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦抗逆性已成为趋势。将来自大豆的*GmDREB*基因转入小麦,转基因小麦对水分胁迫表现较强耐性。先后将拟南芥中的*AtDREB1A*基因和玉米中的*ZmPEPC*的基因转入小麦,转基因小麦耐旱性明显高于受体对照^[45-46]。分别过表达小麦*TaDREB3*基因、*TaNAC48*基因、*TaNRX1*基因、*TaWRKY46*基因和*TaWRKY2*基因的转基因植株在严重水分胁迫下的存活率和抗旱性比野生型高,籽粒产量增加^[47-51]。另外,在小麦中表达大豆的*GmDREB1*基因,转基因植株中参与褪黑素生物合成途径的3种酶的表达上调,证明表达*GmDREB1*促进了小麦褪黑素的合成,提高了小麦的抗旱性^[52]。

由于细菌中的冷激蛋白(CSPs, cold shock proteins)能增强细菌对不良环境的适应能力,将密码子改造的大肠杆菌*SeCspA*和*SeCspB*基因转入小麦,转基因植株在干旱胁迫下丙二醛(MDA)含量、失水率和相对Na⁺含量降低,叶绿素含量和脯氨酸含量增加,抗旱性增强^[53]。分别将*GhDREB*、*W16*、*TaERF3*等抗旱相关基因在小麦中过表达,培育了抗旱性或耐盐性提高的转基因小麦新材料^[54]。将青稞中的甜菜碱醛脱氢酶基因*HvBADH1*转入小麦,转基因株系耐盐性显著提高^[55]。表达从簇毛麦中克隆的*ERF1-V*基因,不但可以提高小麦对白粉病的抗性,而且同时提高了小麦对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性^[31]。在拟南芥中发现,Na⁺/H⁺逆向转运基因*AtNHX1*通过增加Na⁺积累和保持K⁺/Na⁺平衡提高耐盐性,因此将*AtNHX1*转入小麦,转基因小麦对盐胁迫表现出较高的耐受性^[56]。脱落酸胁迫成熟蛋白(ASR, abscisic acid-/stress-/ripening-induced protein)被证明赋予植物对非生物胁迫的耐受性,在小麦中过表达*TaASR1-D*,转基因株系对氧化、渗透、干旱和高盐胁迫的抗性增强^[57]。过表达*TaERFVII*对小麦植株的发育和产量没有负面影响,提高了小麦的耐涝性^[58]。

将从抗逆性强的大豆品种中克隆的转录因子基因*GmTDN1*转入小麦,不但显著提高了小麦的抗旱性,同时提高了小麦的氮肥利用效率;将

GmTDN1 基因导入两个小麦品种后, 在节水和缺氮条件下分别比对照增产 13.0% 和 24.5%^[59]。Liu 等^[60] 发现, 过表达小麦 *TaMPK3* 基因显著降低了小麦在苗期干旱胁迫条件下的存活率, 在成株期干旱胁迫条件下粒宽和粒重降低, 表明其耐旱性和对脱落酸的敏感性降低; 干扰 *TaMPK3* 基因的表达在一定条件下可以提高小麦的耐旱性, 认为该基因可能在小麦干旱胁迫响应与正常生长信号之间起到平衡作用^[60]。另外, 通过全基因组关联分析从小麦中克隆了编码 1 个 DREB 转录因子的抗旱基因 *TaDTG6-B*, 其编码区中 26 bp 的插入/缺失 (InDel574) 与小麦苗期抗旱性显著关联。进一步发现, 过表达 *TaDTG6-B*^{In574} 基因的小麦植株其抗旱性没有改善; 过表达 *TaDTG6-B*^{Del574} 基因显著增强抗旱性, 沉默后明显降低抗旱性。表明 *TaDTG6-B*^{Del574} 基因在调控小麦抗旱性方面具有重要作用^[61]。

3.3 产量和生长发育相关性状改良

小麦产量主要由单位面积穗数、穗粒数和千粒重决定, 利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦产量性状具有较大潜力。将小麦 *TaBT1* 基因的 RNAi 载体转入小麦, 发现单株有效分蘖、小穗数和穗粒数没有显著减少, 粒长减少了 0.7%~1.6%, 粒宽减少了 8.1%~23.3%^[62]。在另一项负调控籽粒大小基因 *TaDA1* 的研究中, 过表达导致粒长减少了 1.7%~5.6%, 粒宽减少了 3.4%~5.1%, 千粒重减少了 2.9~4.5 g; 而 RNAi 载体的转入使得粒长增加了 2.5%~3.5%, 粒宽增加了 4.0%~6.8%, 千粒重增加了 3.6~5.9 g^[63]。过表达小麦 *TaD27* 基因后引起单株分蘖数减少, 但通过 RNAi 抑制 *TaD27* 基因后单株分蘖数增加^[64]。过表达小麦 *TaNAC2-5A* 基因的转基因植株根系发达, 吸收硝酸盐能力增强, 产量性状提高。过表达小麦 *TaNFYA-B1*、*TaNf-YB4* 和 *TaGS2* 基因显著增加了单株穗数、千粒重和籽粒产量^[36]。另外, 将玉米中参与光合作用的转录因子基因 *Dof1* 和 *ZmPEPC* 转入小麦, 转基因植株叶片的光合性能增强, 生物量、穗长和根长增加, 籽粒产量增加^[65]。将水稻中的 *OsPHR2* 转入小麦, 与野生型相比, 转基因株系对磷的吸收效率提高, 产量增加^[66]。将小麦 *TaTOC1s* 基因的 RNAi 载体和小麦 *miR408* 的小 RNA 载体转入小麦, 发现转基因植株抽穗期提前^[67]。Xie 等^[68] 在冬小麦中过表达春化相关基因 *TaVrt2* 和 *TaVrn1*, 转基因植株在无春化或不完全春化的低温条件下可以正常抽穗, 在春化条件下抽穗期比野生型提前。

2021 年以来, 利用转基因技术改良小麦产量性状相继取得了突破性进展。通过图位克隆方法定位到 1 个控制小麦小穗数的主效基因 *TaCol-B5* (该基因编码一个 CONSTANS-like 家族蛋白), 发现 *TaCol-B5* 不同等位基因编码蛋白质存在氨基酸位点突变, 与蛋白激酶 TaK4 反应时蛋白磷酸化水平有差异, 其显性等位变异存在于二粒小麦中, 在小麦种质中非常稀少; 进一步在扬麦 18 中过表达 *TaCol-B5*, 发现转基因株系单株有效分蘖数和株高增加, 籽粒产量比野生型增加 11.9%~19.8%^[69]。Wang 等^[70] 在短柄草中发现了一个小穗数、穗粒数和每株粒数增加的突变体 *bdduo1-1*, 确认该性状由转录因子 *AP2/ERF* 基因编码, 敲除该基因的短柄草的突变体与 *bdduo1-1* 表型相似。进一步敲除小麦品种 Fielder 中 *AP2/ERF* 的同源基因 *DUO-B1*, 转基因株系表现出多排小穗, 生育期和分蘖数与野生型相比没有差异, 但单株粒重、结实率和收获指数增加, 单位面积产量增加约 10%。Wei 等^[71] 对玉米和水稻中共有的与光合作用过程密切相关的 118 个转录因子基因逐一进行分析, 鉴定到 1 个同时受光和低氮调控的转录因子 *OsDREB1C*, 在两个水稻品种日本晴、秀水 134 中过表达 *OsDREB1C* 的转基因植株比野生型对照氮素利用效率提高 25.8%~56.6%, 抽穗期提早 2~19 d, 增产 30.1%~68.3%; 同时, 将该基因转入小麦品种 Fielder 中, 转基因小麦比野生型对照早熟 3~6 d, 增产 17.2%~22.6%。

3.4 品质相关性状改良

随着人们生活水平的提高, 培育优质专用小麦品种的问题越来越突出, 而传统育种方法改良小麦品质的目标性不够强, 需要利用转基因技术和基因编辑技术予以辅助。研究表明, 通过转基因技术在小麦中过表达 *1Ax1*、*ama1*、*SBEIIa* 和 *SBEIIb* 等一些与面粉加工和营养品质相关的目标基因, 转基因小麦株系面包品质提高, 支链淀粉含量增加。将从小山羊草中鉴定的低分子量谷蛋白亚基新基因 *LMW-N13* 转入小麦, 转基因株系与非转基因株系相比淀粉粒大, 蛋白质基质连续紧密, 面团加工特性得到改善^[72]。通过转基因介导的 RNAi 技术沉默小麦中的 *TaBT1* 基因, A 型淀粉颗粒减少了 27.3%~45.5%, B 型淀粉颗粒增加了 0.7~1.1 倍^[62]。将来自高大山羊草的高分子量麦谷蛋白亚基编码基因 *ISx2.3** 转入小麦, 转基因小麦籽粒中的谷蛋白含量增加, 面包体积增大^[73]。

将从硬粒小麦中克隆的籽粒硬度基因 *Pinb-D1x*

转入小麦,改善了籽粒硬度和面粉加工特性^[74]。为了丰富小麦籽粒中的类胡萝卜素含量,将源自细菌的八氢番茄红素合成酶基因 *CrtB* 和类胡萝卜素去饱和酶基因 *CrtI* 在小麦中共表达,转基因小麦籽粒中的总类胡萝卜素含量增加了8倍, β -胡萝卜素含量增加了65倍,维生素A原含量增加了76倍^[75]。在小麦中共表达来自大豆和番茄的叶酸合成相关基因 *Gm8gGCHI* 和 *LeADCS*,转基因株系与野生型相比籽粒中的叶酸含量增加了5.6倍^[76]。

4 利用基因编辑技术改良小麦

4.1 提高抗病性

研究发现,小麦 *TaHRC* 基因编码组氨酸钙结合蛋白,导致小麦对赤霉病的易感性,通过基因编辑随机删除包含 *TaHRC* 基因起始密码子的序列,突变体对赤霉病表现一定抗性^[43]。在感赤霉病的小麦品种中沉默 *His^s* 基因的1个等位基因,感病品种获得了对赤霉病的抗性^[77]。在小麦中敲除 *WFhb1-1* 基因后导致赤霉病严重发生,认为该基因是1个重要的抗赤霉病基因资源,具有潜在的应用价值^[78]。通过基因编辑技术敲除小麦基因 *TaPDIL5-1*,该基因是大麦黄花叶病感病因子基因 *HvPDIL5-1* 的直系同源基因,三敲突变体 *aabbdd1~aabbdd4* 对小麦黄花叶病表现较好抗性,证实 *TaPDIL5-1* 作为感病宿主因子参与小麦 WYMV 感染,且突变体与野生型在株高、抽穗期、穗长、穗数、穗粒数和千粒重等主要农艺性状方面没有显著差异^[79]。在小麦中瞬时表达 CRISPR/Cas9-DNA,发现 *TaNAC2* 基因通过调节枝条分支提高小麦对条锈菌的耐受性^[80],编辑 *TaLPX-1* 基因提高了小麦抗禾谷镰刀菌的能力^[81]。最近的研究发现,同时敲除小麦 A、B、D 基因组上的 *TaPsIPK1* 基因,突变体对中国主要条锈菌流行小种 CYR32、CYR33 和 CYR34 表现广谱抗性^[37]。

在大麦、拟南芥和番茄等植物中,通过使 *Mildew resistance locus (MLO)* 基因产生缺失突变,突变体植株对白粉病菌产生了持久抗性。通过编辑小麦 1A、1B 和 1D 染色体上3个 *TaMLO* 基因,获得了6种纯合突变类型 (*Tamlo-aa*、*Tamlo-bb*、*Tamlo-dd*、*Tamlo-aabb*、*Tamlo-aadd* 和 *Tamlo-aabdd*),3个基因同时编辑的 *Tamlo-aabdd* 突变体对白粉病具有较强抗性,其他5类突变体和野生型对照感染白粉病^[22]。进一步从100多个突变体中发现了一个突变体 *Tamlo-R32*,其在 *TaMLO-B* 附近有304 kb 的大片段 DNA 删除,在对白粉菌表现抗性的同时,对生长

发育和产量没有影响^[82]。Zhang 等^[83]利用基因编辑技术敲除小麦另一个内源基因 *TaEDR1*,突变体同样获得了对白粉病的抗性,证明 *TaEDR1* 也是一个负调控白粉病侵染的基因。

4.2 提高抗逆性

小麦 *TaHAG1* 基因编码1个定位于细胞核中的组蛋白乙酰转移酶^[84],其表达水平与小麦的耐盐性和耐热性呈显著正相关^[85]。分别通过转基因和基因编辑获得该基因过表达、RNAi 和 CRISPR 敲除株系,与野生型对照相比,过表达株系在高盐、高温胁迫下千粒重和粒宽显著提高,耐盐性和耐热性显著增强^[85]。而 RNAi 和 CRISPR 株系耐盐性和耐热性显著降低,在苗期正常条件下转基因株系和突变体株系与野生型有相似的表型,表明 *TaHAG1* 在提高小麦耐盐性和耐热性的同时对其他农艺性状没有负效应^[85]。

编辑小麦中的乙酰乳酸合成酶编码基因 *TaALS-P174*,*ALS* 突变体对烟嘧磺隆除草剂具有良好的抗性;编辑乙酰辅酶 A 羧化酶编码基因 *TaACCCase-A1992*,突变体对精喹禾灵除草剂表现一定耐受性^[86]。另外,这些突变体同时对磺酰脲类、咪唑啉酮类和芳氧基苯氧基丙酸类除草剂具有耐受性。二硝基苯胺是一种广泛使用的高效低毒除草剂,然而,小麦中耐二硝基苯胺的品种很少,限制了二硝基苯胺在小麦生产中的应用。利用腺嘌呤碱基编辑器 (Whee ABE) 编辑位于 1A、1B、1D、4A 和 4D 染色体上的微管蛋白等位基因,蛋氨酸到苏氨酸的突变赋予了小麦突变体对二硝基苯胺的抗性^[87]。

小麦成熟期穗发芽严重影响小麦产量和品质,目前推广小麦品种抗穗发芽能力普遍较弱,通过常规育种途径培育抗穗发芽小麦品种的成效不显著,需要利用基因编辑技术解决小麦穗发芽问题。研究表明,小麦中编码丙氨酸转氨酶的 *TaQsd1* 基因是控制籽粒休眠的关键基因,利用基因编辑技术敲除小麦第4同源群上3个拷贝的 *TaQsd1* 基因获得了 *TaQsd1-aaBbdd*、*TaQsd1-AABbDd* 和 *TaQsd1-AABBDD* 突变类型,进一步利用突变体 *TaQsd1-aaBbdd* 与野生型杂交获得了 *TaQsd1* 位点的8种基因型^[88]。对突变体的鉴定发现, *TaQsd1-AABBDD*、*TaQsd1-aaBBDD*、*TaQsd1-AAbbDD*、*TaQsd1-AABBdd*、*TaQsd1-aabbDD*、*TaQsd1-aaBBdd*、*TaQsd1-AAbbdd* 和 *TaQsd1-aabdd* 在表型上没有明显差异,在适宜条件下 *TaQsd1-aabdd* 基因型与其他7种基因型和野生型相比,萌发时间延迟,萌发率降低^[88]。

4.3 改良产量性状

目前,虽然在小麦中已经定位到多个与每穗小穗数相关的QTL,但克隆到的小穗数控制基因还相对较少,*FT-D1*基因是其中之一。利用CRISPR/Cas9技术敲除小麦品系CB037中的*FT-D1*,筛选到3个无转基因载体整合的*FT-D1*纯合突变体,抽穗期均比野生型CB037晚2~3 d,每穗小穗数显著高于CB037^[89]。研究表明,小麦中的*TaGW7*基因编码TONNEAU1-recruiting motif (TRM)蛋白,影响粒形和粒重。通过编辑小麦B和D基因组中的*TaGW7*,发现两个基因组中的*TaGW7*同时突变或任何一个单独突变都会导致粒宽和粒重增加,但粒长减少^[90]。另外,利用基因编辑技术靶向突变小麦中的*TaARE1*基因,产生了一系列具有部分或全部敲除*TaARE1*等位基因的突变系,在氮素缺乏的条件下与野生型对照相比均表现为耐受性增强,衰老延缓,籽粒产量提高,其中的*AABBdd*和*aabbDD*突变系尤其明显,无生长缺陷的表型^[91]。敲除小麦中参与磷的吸收和转运的*TaPHO2s*基因,在低磷营养条件下突变体与野生型对照相比磷吸收和籽粒产量显著提高^[92]。

4.4 改良品质性状

植酸(PA, phytic acid)是一种重要的抗营养剂,存在于谷物中降低人体对铁和锌的吸收利用度,其中肌醇五磷酸激酶1(IPK1, inositol pentaphosphate kinase 1)编码基因是PA生物合成的关键基因。利用CRISPR/Cas9技术靶向突变小麦中的*TaIPK1*基因,突变体籽粒中的植酸含量降低,铁和锌的积累水平提高^[93]。小麦ODORANT1通常结合在储藏蛋白合成相关基因的启动子区,抑制启动子的活性,进而抑制储藏蛋白的合成,利用基因编辑技术敲除小麦中的*ODORANT1*基因,小麦籽粒中储藏蛋白的总含量升高11.4%~19.4%^[94]。在敲除小麦*TaNAC019*基因的研究中,发现突变体中大部分贮藏蛋白基因以及部分淀粉合成相关基因表达下降,导致面筋和淀粉含量降低,认为该基因调控谷蛋白和淀粉的积累,在小麦产量和加工品质相关性状形成中具有关键作用^[95]。

面粉中的谷蛋白富含脯氨酸和谷氨酰胺,容易产生不易消化的多肽,引发面筋过敏反应,肾病或糖尿病人摄入过多会加重肾脏负担。其中, α -和 ω -醇溶蛋白及高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS, high molecular weight glutenin subunit)是依赖运动诱发性过敏症最主要的原因。因此,降低小麦中醇溶蛋白的含量,培育低面筋含量小麦品种作为易感人

群的专用面粉,对于降低乳糜泻、哮喘病和依赖运动诱发性过敏症的发病率具有重要价值。在 α -醇溶蛋白基因高度保守的乳糜泻过敏肽区域选取两个特异的sgRNA,利用CRISPR/Cas9技术对小麦中 α -醇溶蛋白基因进行编辑,获得了低面筋小麦突变体;在其中的1个突变体中,35个 α -醇溶蛋白基因发生了突变,大大减少了小麦籽粒中的过敏原,免疫反应性降低了85%^[96]。同时发现,这些低面筋的基因编辑材料中没有转基因成分存在,经过安全性评价后有望用于生产低面筋食品^[96]。在随后一项编辑小麦醇溶蛋白编码基因的研究中,突变体籽粒中醇溶蛋白含量也大幅地降低^[97]。同样,利用CRISPR/Cas9技术编辑硬粒小麦中淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂编码基因,降低了硬粒小麦中过敏蛋白^[98]。另外,面团在烘焙过程中,其中的天冬酰胺会转化为丙烯酰胺,后者是一种可能的致癌物。利用基因编辑技术敲除小麦天冬酰胺合成酶基因*TaASN2*,突变体籽粒中天冬酰胺大量降低,可望开发出极低天冬酰胺的专用小麦品种^[99]。

4.5 修饰生长发育特性

目前小麦杂种优势还没有得到充分利用,杂种品种还比较缺乏,主要原因之一是缺乏优良而稳定的不育系。利用CRISPR/Cas9系统敲除不同小麦品种中A和D基因组上的*TaMs1*基因(B基因组上的*TaMs1*为不完整序列的假基因),获得了双等位基因移码编辑植株,突变体完全雄性不育,获得了无转基因成分存在的雄性不育系^[100]。通过敲除小麦育性相关基因*TaMs45*,3个同源基因同时编辑的纯合突变体在正常生长条件下表现为花粉败育,表明CRISPR/Cas9技术可用于快速创制具有商业化小麦品种遗传背景的雄性不育系^[101]。需要指出的是,太谷核不育小麦和矮败小麦是我国特有的种质资源,其不育性由位于小麦4DS染色体上的显性基因*TaMs2*控制,杂交后代中总是分离出一半可育株和一半不育株。虽然利用矮败小麦和太谷核不育小麦进行轮回选择育种,已经培育了多个优良小麦品种。但是,小麦新品种只能从轮回选择群体衍生的优良可育材料中选择,优良不育材料由于育性分离不能直接用于育种选择。根据*TaMs2*基因序列设计编辑靶点,以矮败小麦与其他小麦授粉后的杂种幼胚为受体材料,利用CRISPR/Cas9体系编辑*TaMs2*基因,表现矮秆的突变体携带*Rht10*基因,小花中含有完整花药,花粉粒具有活性,可以正常结实,表明利用基因编辑技术可以彻底恢复矮败小麦的

育性^[102]。

传统诱导小麦单倍体主要通过花药培养、小孢子培养和远缘杂交介导的染色体消除等技术,但这些方法依赖于基因型和离体培养等条件,存在诱导效率低、操作复杂等缺点,限制了单倍体技术在小麦育种中的应用。而在玉米遗传资源中鉴定到了可以诱导玉米产生单倍体的材料Stock6,发现其诱导产生单倍体籽粒的性状由磷脂酶编码基因 *MTL/ZmPLA1/NLD* 控制,进一步利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *MTL/ZmPLA1/NLD* 基因,突变体表现出与诱导系相同的功能。通过设计特异性靶向小麦 *TaPLA* (*TaMTL/TaNLD*) 基因的 sgRNA 序列,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除小麦 4A 和 4D 染色体上共两个拷贝的 *TaPLA* 基因,获得了单倍体诱导系,单倍体诱导率为 2%~3%^[103]。中国农业科学院作物科学研究所转基因中心小麦实验室利用优化的 CRISPR/SpCas9 体系和双靶点策略,对小麦 *TaMTL* 进行编辑,获得了大量编辑植株,发现了碱基缺失和大片段删除等突变,并发现了两个靶点间序列删除后存在反向插入现象,大片段删除效率达 40.2%,编辑效率 57.5%,部分突变体中同时编辑了 3 个拷贝的 *TaMTL* 基因,单倍体诱导率高达 18.9% (图 1A、B)。另外,首次在突变体中发现了无胚型及胚和胚乳双无型籽粒 (图 1C),为探究 *TaMTL* 基因沉默导致胚胎和胚乳的败育机理提供了材料^[25]。参与植物着丝粒复合蛋白募集和稳定的组蛋白 CENTROMERIC HISTONE3 (*CENH3*) 的编码基因也与单倍体诱导有关。鉴定发现,小麦中存在 *CENH3* 的同源基因 *TaCenH3α* 和 *TaCenH3β*,其中 *TaCenH3α* 在子房和花粉中的表达高于 *TaCenH3β*;通过基因编辑技术敲除 *TaCENH3α* 基因,获得了可以诱导单倍体的突变体,单倍体诱导率 7%~8%^[104]。上述突变体材料可诱导小麦杂交后代产生单倍体,将加速优良基因型纯合,加快小麦育种进程,提高小麦单倍体育种效率。

5 问题和展望

与传统的杂交育种和诱变育种等方法相比,转基因育种和基因编辑育种目标性强、精准性高,可以进行人工设计和操作,可以有效弥补传统育种方法存在的缺陷,但转基因和基因编辑都依赖于植物组织培养和植株再生,存在着强烈的基因型依赖性。虽然利用再生相关基因可以有效解决小麦基因型依赖性问题,但基于小麦幼胚的转化效率与母体植株和幼胚生理状态的关系很大,生长期间的温

度条件、光照条件、病虫害和农药施用等均影响受体材料的生理状态,进而影响了小麦遗传转化效率。中国农业科学院作物科学研究所转基因中心小麦实验室通过杂交、回交和分子标记辅助选择,将抗白粉病基因 *Pm21* 和 *PmV* 导入了易转化材料 Fielder,培育了新的抗白粉病模式基因型,主要农艺性状与 Fielder 相似或有所改进,再生效率和转化效率比 Fielder 提高,生长期间不用施用化学药剂防治白粉病^[105]。单子叶植物成熟胚的生理状态均匀一致,转化操作不受生长季节的限制,是比较理想的转化材料。利用 *BBM* 和 *WUS2* 辅助农杆菌转化玉米成熟胚、幼叶等组织,转化效率 15%~20%^[14]。之前的研究表明,利用小麦成熟胚能够获得转基因植株,但转化效率较低^[6],在利用 *BBM*、*WUS2*、*GRF*、*GIF* 和 *TaWOX5* 等多个再生基因辅助的基础上,挖掘和利用更多再生相关基因,可提高小麦成熟胚转化效率。



A: *TaMTL-aabdd* 突变体自交群体植株表型,红色标记的为单倍体植株,表现为不育;B:单倍体植株染色体观察,含有 21 条染色体;C: *TaMTL-aabdd* 突变体自交群体籽粒表型,左侧一粒为正常籽粒,右侧 2 粒为无胚籽粒

A: Plant phenotype in the self-crossing offspring of *TaMTL-aabdd* mutant, in which the plants labeled in red are haploid plants showing sterility; B: Chromosome observation of the haploid plants with 21 chromosomes; C: Grain phenotype in the self-crossing offspring of *TaMTL-aabdd* mutants, in which the grain on the left is normal type, and the two grains on the right are embryoless type

图 1 小麦 *TaMTL* 基因编辑突变体诱导单倍体植株鉴定
Fig.1 Identification of haploid plants in the *TaMTL* gene editing mutants of wheat

利用转基因技术和基因编辑技术创制的作物新品种用于产业化的主要限制是安全性问题,培育

无筛选标记转基因植物非常必要。在众多获得无筛选标记转基因植株的技术中,共转化法效率最高,应用最为广泛。中国农业科学院作物科学研究所转基因中心小麦实验室通过构建双T-DNA载体,利用农杆菌转化幼胚,经筛选培养和分子检测,获得共转化目标基因和标记基因的T₀转基因植株,在自交后的T₁植株中鉴定到只含有目标基因而不含有筛选标记基因的转基因植株,无筛选标记转基因植株出现频率为5.2%。此外,利用转化效率较高的PureWheat技术将不含筛选标记的表达载体转化小麦模式基因型,在培养基中不添加筛选剂的情况下可以大量获得再生植株,其中2%左右的植株为转基因植株(无筛选标记)^[10]。利用再生相关基因GRF-GIF进一步促进了农杆菌转化后的植株再生,可以获得不含筛选标记的转基因植株,载体上不用构建筛选标记,转化后的愈伤组织诱导和分化培养基中不需要添加筛选剂^[16]。

基因编辑技术可以不涉及外源DNA序列的整合,在经过遗传转化操作获得的转基因植株后代中很容易鉴定到不含外源DNA序列的基因编辑植株,在本质上等同于传统育种方法获得的遗传变异,理论上比转基因技术培育的作物品种具有更高的生物安全性。然而,基因编辑也利用了转基因技术,其产业化应用也需要较为严格的安全性评价。早期的研究表明,小麦与玉米杂交能够诱导小麦孤雌发育,进而产生小麦单倍体(玉米染色体在合子发育前期由于复制和分离与小麦染色体不同步而自然消除),染色体加倍后可以获得正常结实的小麦双倍体植株^[106]。基于上述发现,将小麦GRASSY TILLER1 (*TaGT1*)基因的sgRNA和Cas9基因构建表达载体转化玉米,获得玉米转基因植株,然后利用转基因玉米作为花粉供体与小麦杂交,实现了对小麦*TaGT1*基因的编辑,突变体中不含有来自玉米的外源DNA^[107]。在随后的一项研究中,Budhagatapalli等^[108]根据小麦BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (*BRI1*)基因和SEMI-DWARF 1 (*SD1*)序列设计编辑靶点,将构建的Cas9/gRNA表达载体转入玉米,获得了5个Cas9和gRNA表达水平较高的转基因玉米植株;进一步用转基因玉米与小麦杂交,在174个小麦单倍体植株中检测到了15株靶向编辑突变体,编辑效率3.6%~50.0%,突变体中同样不含有外源DNA。利用小麦与玉米杂交技术编辑小麦内源基因的过程中没有利用转基因技术,不牵扯到生物安全性评价问题,获得的小麦品种在产业化应用方面

具有广阔前景。

随着小麦转基因、基因编辑技术的不断发展和完善,已经能够高效获得小麦转基因植株和基因编辑植株,基本克服了基因型的依赖性,可以定点敲除小麦基因组中的不利基因或负调控基因,实现目标性状的精准改良,将大大提高小麦定向遗传改良的效率。今后的研究重点应该围绕小麦生产和小麦育种中需要迫切解决的重大问题,明确控制拟改良性状的关键基因、作用方式和DNA序列,进而利用转基因技术或基因编辑技术进行解决,培育目标性状显著改良且对产量和品质没有负影响的遗传修饰品种。

参考文献

- [1] Tesfaye K D. Climate change in the hottest wheat regions. *Nature Food*, 2021, 2(1): 8-9
- [2] 耿宁杰. 中国转基因作物产业化现状及法规问题. *分子植物育种*, 2022, 20(17): 5675-5679
Geng N J. Research on the current situation and legal issues of the industrialization of genetically modified crops in China. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(17): 5675-5679
- [3] 黄耀辉, 王艺洁, 杨立桃, 焦悦, 付仲文. 生物育种新技术作物的安全管理. *生物技术进展*, 2022, 12(2): 198-204
Huang Y H, Wang Y J, Yang L T, Jiao Y, Fu Z W. Safety management of new technology crops in biological breeding. *Advances in Biotechnology*, 2022, 12(2): 198-204
- [4] Vasil V, Srivastava V, Castillo A M, Fromm M E, Vasil I K. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Nature Biotechnology*, 1993, 11(12): 1553
- [5] Cheng M, Fry J E, Pang S, Zhou H, Hironaka C M, Duncan D R, Conner T W, Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 1997, 115(3): 971-980
- [6] Li J R, Ye X G, An B Y, Du L P, Xu H J. Genetic transformation of wheat: Current status and future prospects. *Plant Biotechnology Reports*, 2012, 6(3): 183-193
- [7] Wang K, Riaz B, Ye X G. Wheat genome editing expedited by efficient transformation techniques: Progress and perspectives. *The Crop Journal*, 2018, 6(1): 22-31
- [8] 张伟, 尹米琦, 赵佩, 王轲, 杜丽璞, 叶兴国. 我国部分主推小麦品种组织培养再生能力评价. *作物学报*, 2018, 44(2): 208-217
Zhang W, Yin M Q, Zhao P, Wang K, Du L P, Ye X G. Evaluation of tissue culture regeneration ability of some main wheat varieties in China. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(2): 208-217
- [9] Wang K, Liu H Y, Du L P, Ye X G. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-

- transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(5): 614-623
- [10] Richardson T, Thistleton J, Higgins T J, Howitt C, Ayliffe M. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 119(3): 647-659
- [11] Hayta S, Smedley M A, Demir S U, Blundell R, Hinchliffe A, Atkinson N, Harwood W A. An efficient and reproducible *Agrobacterium* mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*, 2019, 15(1): 121
- [12] Ishida Y, Tsunashima M, Hiei Y, Komari T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1223: 189-198
- [13] 叶兴国, 余茂云, 王轲, 杜丽璞, 徐惠君. 植物组织培养再生相关基因鉴定、克隆和应用研究进展. *作物学报*, 2012, 38(2): 191-201
- Ye X G, She M Y, Wang K, Du L P, Xu H J. Research progress in identification, cloning and application of genes related to plant tissue culture regeneration. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(2): 191-201
- [14] Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho M J, Scelonge C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J, Wang L J, Ryan L, Khan T, Chow-Yiu J, Hua W, Yu M, Banh J, Bao Z M, Brink K, Igo E, Rudrappa B, Shamseer P M, Bruce W, Newman L, Shen B, Zheng P Z, Bidney D, Falco S C, Register III J C, Zhao Z Y, Xu D P, Jones T J, Gordon-Kamm W J. Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation. *The Plant Cell*, 2016, 28: 1998-2015
- [15] Mookkan M, Nelson-Vasilchik K, Hague J, Zhang Z J, Kausch A P. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators *BABY BOOM* and *WUSCHEL2*. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(9): 1477-1491
- [16] Debernardi J M, Tricoli D M, Ercoli M F, Hayta S, Ronald P, Palatnik J F, Dubcovsky J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(11): 1274-1279
- [17] Wang K, Shi L, Liang X N, Zhao P, Wang W X, Liu J X, Chang Y N, Hiei Y, Yanagihara C, Du L P, Ishida Y, Ye X G. The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nature Plants*, 2022, 8(2): 110-117
- [18] Bibikova M, Golic M, Golic K G, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-1175
- [19] Ran Y, Patron N, Kay P, Wong D, Buchanan M, Cao Y Y, Sawbridge T, Davies J P, Mason J, Webb S R, Spangenberg G, Ainley W M, Walsh T A, Hayden M J. Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(12): 2088-2101
- [20] Menz J, Modrzejewski D, Hartung F, Wilhelm R, Sprink T. Genome edited crops touch the market: A view on the global development and regulatory environment. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 586027
- [21] Becker S, Boch J. TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene and Genome Editing*, 2021, DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666388021000071?via%3Dihub>
- [22] Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, Zhang Y, Liu J X, Gao C X, Qiu J L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9): 947-951
- [23] Shan Q W, Wang Y P, Li J, Gao C X. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*, 2014, 9(10): 2395-2410
- [24] Zhang S J, Zhang R Z, Song G Q, Gao J, Li W, Han X D, Chen M L, Li Y L, Li G Y. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 302
- [25] Liu H Y, Wang K, Jia Z M, Gong Q, Lin Z S, Du L P, Pei X W, Ye X G. Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(4): 1337-1349
- [26] Dongjin K, Megan H, Eleanor B, Hikmet B. Efficient genome editing in wheat using Cas9 and Cpf1 (AsCpf1 and LbCpf1) nucleases. *Functional & Integrative Genomics*, 2021, 21(3-4): 1-12
- [27] Janni M, Sella L, Favaron F, Blechl A E, De L G, D'Ovidio R. The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(2): 171-177
- [28] Fahim M, Ayala-Navarrete L, Millar A A, Larkin P. Hairpin RNA derived from viral *Nia* gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(7): 821-834
- [29] Chen M, Sun L Y, Wu H Y, Chen J, Ma Y Z, Zhang X X, Du L P, Cheng S H, Zhang B Q, Ye X G, Pang J L, Zhang X M, Li L C, Andika I B, Chen J P, Xu H J. Durable field resistance to wheat yellow mosaic virus in transgenic wheat containing the antisense virus polymerase gene. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(4): 447-456
- [30] Liu P, Zhang X X, Zhang F, Xu M Z, Ye Z X, Wang K, Liu S, Han X L, Cheng Y, Zhong K L, Zhang T Y, Li L Z, Ma Y Z, Chen M, Chen J P, Yang J. A virus-derived siRNA activates plant immunity by interfering with ROS scavenging. *Molecular Plant*, 2021, 14(7): 1088-1103
- [31] Xing L P, Di Z C, Yang W W, Liu J Q, Li M N, Wang X J, Cui C F, Wang X Y, Wang X E, Zhang R Q, Xiao J, Cao A Z. Overexpression of *ERFI-V* from *Haynaldia villosa* can enhance the resistance of wheat to powdery mildew and increase the tolerance to salt and drought stresses. *Frontiers in*

- Plant Science, 2017, 8: 1948
- [32] Jing Y X, Liu J, Liu P, Ming D F, Sun J Q. Overexpression of *TaJAZ1* increases powdery mildew resistance through promoting reactive oxygen species accumulation in bread wheat. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1-15
- [33] Eissa H F, Hassanien S E, Ramadan A M, El-Shamy M M, Saleh O M, Shokry A M, Abdelsattar M, Morsy Y B, El-Maghraby M A, Alameldin H F, Hassan S M, Osman G H, Mahfouz H T, Gad E-K G A, Madkour M A, Bahieldin A. Developing transgenic wheat to encounter rusts and powdery mildew by overexpressing barley *chi26* gene for fungal resistance. *Plant Methods*, 2017, 13(1): 41
- [34] Liu W, Frick M, Huel R, Nykiforuk C L, Wang X M, Gaudet D A, Eudes F, Conner R L, Kuzyk A, Chen Q, Kang Z S, Laroche A. The stripe rust resistance gene *Yr10* encodes an evolutionary-conserved and unique CC-NBS-LRR sequence in wheat. *Molecular Plant*, 2014, 7(12): 1740-1755
- [35] Kaur J, Fellers J, Adholey A, Velivelli S L S, El-Mounadi K, Nersesian N, Clemente T, Shah D. Expression of apoplast-targeted plant defensin *MtDef4.2* confers resistance to leaf rust pathogen *Puccinia triticina* but does not affect mycorrhizal symbiosis in transgenic wheat. *Transgenic Research*, 2017, 26(1): 37-49
- [36] Luo M, Xie L Q, Chakraborty S, Wang A H, Matny O, Jugovich M, Kolmer J A, Richardson T, Bhatt D, Hoque M, Patpour M, Sorensen C, Ortiz D, Dodds P, Steuernagel B, Wulff Brande B H, Upadhyaya N M, Mago R, Periannan S, Lagudah E, Freedman R, Lynne R T, Steffenson B J, Ayliffe M. A five-transgene cassette confers broad-spectrum resistance to a fungal rust pathogen in wheat. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(5): 561-566
- [37] Wang N, Tang C L, Fan X, He M Y, Gan P F, Zhang S, Hu Z Y, Wang X D, Yan T, Shu W X, Yu L G, Zhao J R, He J N, Li L L, Wang J F, Huang X L, Huang L L, Zhou J M, Kang Z S, Wang X J. Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad-spectrum resistance to rust fungi. *Cell*, 2022, 185(16): 2961-2974
- [38] Zhang Z Y, Liu X, Wang X D, Zhou M P, Zhou X Y, Ye X G, Wei X M. An R2R3 MYB transcription factor in wheat, *TaPIMPI*, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought stresses through regulation of defense- and stress-related genes. *The New Phytologist*, 2012, 196(4): 1155-1170
- [39] Chen L, Zhang Z Y, Liang H X, Liu H X, Du L P, Xu H J, Xin Z Y. Overexpression of *TiERF1* enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(15): 4195-4204
- [40] Zhu X L, Rong W, Wang K, Guo W, Zhou M P, Wu J Z, Ye X G, Wei X N, Zhang Z Y. Overexpression of *TaSTT3b-2B* improves resistance to sharp eyespot and increases grain weight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 20(4): 777-793
- [41] Okubara P A, Blechl A E, McCormick S P, Alexander N J, Dill-Macky R, Hohn T M. Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 106(1): 74-83
- [42] Li Z, Zhou M P, Zhang Z Y, Ren L J, Du L P, Zhang B Q, Xu H J, Xin Z Y. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Functional & Integrative Genomics*, 2011, 11(1): 63-70
- [43] Su Z Q, Bernardo A, Tian B, Chen H, Wang S, Ma H X, Cai S B, Liu D T, Zhang D D, Li T, Trick H, Paul S A, Yu J M, Zhang Z Y, Bai G H. A deletion mutation in *TaHRC* confers *Fhb1* resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Nature Genetics*, 2019, 51(7): 1099-1105
- [44] Wang H W, Sun S L, Ge W Y, Zhao L F, Hou B Q, Wang K, Lyu Z F, Chen L Y, Xu S S, Guo J, Li M, Su P S, Li X F, Wang G P, Bo C Y, Fang X J, Zhuang W W, Cheng X X, Wu J W, Dong L H, Chen W Y, Li W, Xiao G L, Zhao J X, Hao Y C, Xu Y, Gao Y, Liu W J, Liu Y H, Yin H Y, Li J Z, Li X, Zhao Y, Wang X Q, Ni F, Ma X, Li A F, Xu S S, Bai G H, Nevo E, Gao C X, Ohm H, Kong L R. Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Science*, 2020, 368(6493): 5435
- [45] Wang K, Gong Q, Ye X G. Recent developments and applications of genetic transformation and genome editing technologies in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133(5): 1603-1622
- [46] Peng C J, Xu W G, Hu L, Li Y, Qi X L, Wang H W, Hua X, Zhao M Z. Effects of the maize C4 phosphoenolpyruvate carboxylase (*ZmPEPC*) gene on nitrogen assimilation in transgenic wheat. *Plant Growth Regulation*, 2018, 84(1): 191-205
- [47] Shavrukov Y, Baho M, Lopato S, Langridge P. The *TaDREB3* transgene transferred by conventional crossings to different genetic backgrounds of bread wheat improves drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 313-322
- [48] Chen J, Gong Y, Gao Y, Zhou Y B, Chen M, Xu Z S, Guo C H, Ma Y Z. *TaNAC48* positively regulates drought tolerance and ABA responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Crop Journal*, 2020, 9(3): 785-793
- [49] Zhang Y R, Zhou J F, Wei F, Song T Q, Yu Y, Yu M, Fan Q R, Yang Y N, Xue G, Zhang X K. Nucleoredoxin gene *TaNRX1* positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 756338
- [50] Yu Y G, Zhang L. Overexpression of *TaWRKY46* enhances drought tolerance in transgenic wheat. *Cereal Research Communications*, 2021, 21(4): 1321
- [51] Gao H M, Wang Y F, Xu P, Zhang Z B. Overexpression of a WRKY transcription factor *TaWRKY2* enhances drought stress tolerance in transgenic wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 997
- [52] Zhou Y B, Chen M, Guo J K, Wang Y X, Min D H, Jiang Q

- Y, Ji H T, Huang C Y, Wei W, Xu H J, Chen X, Li L C, Xu Z S, Cheng X G, Wang C X, Wang C S, Ma Y Z. Overexpression of soybean *DREB1* enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(6): 1842-1857
- [53] Yu T F, Xu Z S, Guo J K, Wang Y X, Abernathy B, Fu J D, Chen X, Zhou Y B, Chen M, Ye X G, Ma Y Z. Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene *SeCspA*. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 44050
- [54] Rong W, Qi L, Wang A Y, Ye X G, Du L P, Liang H X, Xin Z Y, Zhang Z Y. The ERF transcription factor *TaERF3* promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(4): 468-479
- [55] Li P F, Cai J, Luo X, Chang T L, Li J X, Zhao Y W, Xu Y. Transformation of wheat *Triticum aestivum* with the *HvBADH1* transgene from hulless barley improves salinity-stress tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41(9): 1-14
- [56] Moghaieb R E A, Sharaf A N, Soliman M H, El-Arabi N I, Momtaz O A. An efficient and reproducible protocol for the production of salt tolerant transgenic wheat plants expressing the *Arabidopsis AtNHX1* gene. *GM Crops & Food*, 2014, 5(2): 132-138
- [57] Qiu D, Hu W, Zhou Y, Xiao J, Hu R, Wei Q H, Zhang Y, Feng J L, Sun F S, Sun J T, Yang G X, He G Y. *TaASR1-D* confers abiotic stress resistance by affecting ROS accumulation and ABA signaling in transgenic wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(8): 1588-1601
- [58] Wei X N, Xu H J, Rong W, Ye X G, Zhang Z Y. Constitutive expression of a stabilized transcription factor group VII ethylene response factor enhances waterlogging tolerance in wheat without penalizing grain yield. *Plant, Cell & Environment*, 2019, 42(5): 1471-1485
- [59] Zhou Y B, Liu J, Guo J K, Wang Y X, Ji H T, Chu X S, Xiao K, Qi X L, Hu L, Li H, Hu M Y, Tang W S, Yan J J, Yan H S, Bai X X, Ge L H, Lyu M J, Chen J, Xu Z S, Chen M, Ma Y Z. *GmTDN1* improves wheat yields by inducing dual tolerance to both drought and low-N stress. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(8): 1606-1621
- [60] Liu Y, Yu T F, Li Y T, Zheng L, Lu Z W, Zhou Y B, Chen J, Chen M, Zhang J P, Sun G Z, Cao X Y, Liu Y W, Ma Y Z, Xu Z S. Mitogen-activated protein kinase *TaMPK3* suppresses ABA response by destabilizing *TaPYL4* receptor in wheat. *New Phytologist*, 2022, 236(1): 114-131
- [61] Mei F M, Chen B, Du L Y, Li S M, Zhu D H, Chen N, Zhang Y F, Li F F, Wang Z X, Cheng X X, Ding L, Kang Z S, Mao H D. A gain-of-function allele of a DREB transcription factor gene ameliorates drought tolerance in wheat. *Plant Cell*, 2022, DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35959993/>
- [62] Wang Y M, Hou J, Liu H, Li T, Wang K, Hao C Y, Liu H X, Zhang X Y. *TaBT1*, affecting starch synthesis and thousand kernel weight, underwent strong selection during wheat improvement. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(5): 1497-1511
- [63] Liu H, Li H F, Hao C Y, Wang K, Wang Y M, Qin L, An D G, Li T, Zhang X Y. *TaDA1*, a conserved negative regulator of kernel size, has an additive effect with *TaGW2* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(5): 1330-1342
- [64] Zhao B, Wu T T, Ma S S, Jiang D J, Bie X M, Sui N, Zhang X S, Wang F. *TaD27-B* gene controls the tiller number in hexaploid wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 513-525
- [65] Pena P A, Quach T, Sato S, Ge Z X, Nersesian N, Changa T, Dweikat I, Soundararajan M, Clemente T E. Expression of the maize *Dof1* transcription factor in wheat and sorghum. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 434
- [66] Li Y, Fang Y H, Peng C J, Hua X, Zhang Y, Qi X L, Li Z L, Wang Y M, Hu L, Xu W G. Transgenic expression of rice *OsPHR2* increases phosphorus uptake and yield in wheat. *Protoplasma*, 2022, 259(5): 1271-1282
- [67] Zhao X Y, Hong P, Wu J Y, Chen X B, Ye X G, Pan Y Y, Wang J, Zhang X S. The *tae-miR408*-mediated control of *TaTOC1* genes transcription is required for the regulation of heading time in wheat. *Plant Physiology*, 2016, 170(3): 1578-1594
- [68] Xie L, Zhang Y, Wang K, Luo X M, Xu D A, Tian X L, Li L L, Ye X G, Xia X C, Li W X, Yan L L, Cao S H. *TaVrt2*, an SVP-like gene, cooperates with *TaVrn1* to regulate vernalization-induced flowering in wheat. *The New Phytologist*, 2019, 231(2): 834-848
- [69] Zhang X Y, Jia H Y, Li T, Wu J Z, Nagarajan R, Lei L, Powers C, Kan C C, Hua W, Liu Z Y, Chen C, Carver B F, Yan L L. *TaCol-B5* modifies spike architecture and enhances grain yield in wheat. *Science*, 2022, 376(6589): 180-183
- [70] Wang Y G, Du F, Wang J, Wang K, Tian C H, Qi X Q, Lu F, Liu X G, Ye X G, Jiao Y L. Improving bread wheat yield through modulating an unselected *AP2/ERF* gene. *Nature Plants*, 2022, 8(8): 930-939
- [71] Wei S B, Li X, Lu Z F, Zhang H, Ye X Y, Zhou Y J, Li J, Yan Y Y, Pei H C, Duan F Y, Wang D Y, Chen S, Wang P, Zhang C, Shang L G, Zhou Y, Yan P, Zhao M, Huang J R, Bock R, Qian Q, Zhou W B. A transcriptional regulator that boosts grain yields and shortens the growth duration of rice. *Science*, 2022, 377(6604): 8455
- [72] Du X Y, Wei J L, Luo X, Liu Z G, Qian Y Q, Zhu B, Weng Q B, Tang H. Low-molecular-weight glutenin subunit *LMW-N13* improves dough quality of transgenic wheat. *Food Chemistry*, 2020, 327: 127048
- [73] Qiu Y L, Chen H Q, Zhang S X, Wang J, Du L P, Wang K, Ye X G. Development of a wheat material with improved bread-making quality by overexpressing *HMW-GS ISk2.3** from *Aegilops longissimi*. *The Crop Journal*, 2022, DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214514122000848>
- [74] Ma X L, Xue H, Sun J Z, Sajjad M, Wang J, Yang W L, Li

- X, Zhang A M, Liu D C. Transformation of *Pinb-D1x* to soft wheat produces hard wheat kernel texture. *Journal of Cereal Science*, 2020, 91(C): 102889
- [75] Wang C, Zeng J, Li Y, Hu W, Chen L, Miao Y J, Deng P Y, Yuan C H, Ma C, Chen X, Zang M L, Wang Q, Li K X, Chang J L, Wang Y S, Yang G X, He G Y. Enrichment of provitamin a content in wheat (*Triticum aestivum* L.) by introduction of the bacterial carotenoid biosynthetic genes *CrtB* and *CrtI*. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(9): 2545-2556
- [76] Liang Q J, Wang K, Liu X L, Bisma R, Jiang L, Wan X, Ye X G, Zhang C Y. Improved folate accumulation in genetically modified maize and wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(5): 1539-1551
- [77] Li G Q, Zhou J Y, Jia H Y, Gao Z X, Fan M, Luo Y J, Zhao P T, Xue S L, Li N, Yuan Y, Ma S W, Kong Z X, Jia L, An X, Jiang G, Liu W X, Cao W J, Zhang R R, Fan J C, Xu X W, Liu Y F, Kong Q Q, Zheng S H, Wang Y, Qin B, Cao S Y, Ding Y X, Shi J X, Yan H S, Wang X, Ran C F, Ma Z Q. Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to *Fusarium* head blight. *Nature Genetics*, 2019, 51(7): 1106-1112
- [78] Paudel B, Zhuang Y B, Galla A, Dahal S, Qiu Y J, Ma A J, Raihan T, Yen Y. *WFhb1-1* plays an important role in resistance against *Fusarium* head blight in wheat. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7794
- [79] Kan J H, Cai Y, Cheng C Y, Jiang C C, Jin Y L, Yang P. Simultaneous editing of host factor gene *TaPDIL5-1* homoeoalleles confers wheat yellow mosaic virus resistance in hexaploid wheat. *The New Phytologist*, 2022, 234(2): 340-344
- [80] Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y P, Liu J X, Chen K L, Qiu J L, Gao C X. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 12617
- [81] Wang W, Pan Q L, He F, Akhunova A, Chao S, Trick H, Akhunov E. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *The CRISPR Journal*, 2018, 1(1): 65-74
- [82] Li S N, Lin D X, Zhang Y W, Deng M, Chen Y X, Lv B, Li B S, Lei Y, Wang Y P, Zhao L, Liang Y T, Liu J X, Chen K L, Liu Z Y, Xiao J, Qiu J L, Gao C X. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature*, 2022, DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35140403/>
- [83] Zhang Y W, Bai Y, Wu G H, Zou S H, Chen Y F, Gao C X, Tang D Z. Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *The Plant Journal*, 2017, 91(4): 714-724
- [84] Zheng M, Lin J C, Liu X B, Chu W, Li J P, Gao Y J, An K X, Song W J, Xin M M, Yao Y Y, Peng H R, Ni Z F, Sun Q X, Hu Z R. Histone acetyltransferase *TaHAG1* acts as a crucial regulator to strengthen salt tolerance of hexaploid wheat. *The Plant Physiology*, 2022, 186(4): 1591-1569
- [85] Lin J C, Song N, Liu D B, Liu X B, Chu W, Li J P, Chang S M, Liu Z H, Chen Y M, Yang Q, Liu X Y, Yao Y Y, Guo W L, Xin M M, Peng H R, Ni Z F, Sun Q X, Hu Z R. Histone acetyltransferase *TaHAG1* interacts with *TaNAACL* to promote heat stress tolerance in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(9): 1645-1647
- [86] Zhang R, Liu J X, Chai Z Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, Chen K L, Li J Y, Jiang L J, Gao C X. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nature Plants*, 2019, 5(5): 480-485
- [87] Han H N, Wu Z W, Zheng L, Han J Y, Zhang Y, Li J H, Zhang S J, Li G Y, Ma C L, Wang P P. Generation of a high-efficiency adenine base editor with *Tada8e* for developing wheat dinitroaniline-resistant germplasm. *The Crop Journal*, 2022, 10(2): 368-374
- [88] Hisano H, Hoffie R E, Abe F, Munemori H, Matsuura T, Endo M, Mikami M, Nakamura S, Kumlehn J, Sato K. Regulation of germination by targeted mutagenesis of grain dormancy genes in barley. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 20(1): 37-46
- [89] Chen Z Y, Ke W S, He F, Chai L L, Cheng X J, Xu H W, Wang X B, Du D J, Zhao Y D, Chen X Y, Xing J W, Xin M M, Guo W L, Hu Z R, Su Z Q, Liu J, Peng H R, Yao Y Y, Sun Q X, Ni Z F. A single nucleotide deletion in the third exon of *FT-D1* increases the spikelet number and delays heading date in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(5): 920-933
- [90] Wang W, Pan Q L, Tian B, He F, Chen Y Y, Bai G H, Akhunova A, Trick H N, Akhunov E. Gene editing of the wheat homologs of *TONNEAU1*-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *The Plant Journal*, 2019, 100(2): 251-264
- [91] Zhang J H, Zhang H T, Li S Y, Li J Y, Yan L, Xia L Q. Increasing yield potential through manipulating of an *ARE1* ortholog related to nitrogen use efficiency in wheat by CRISPR/Cas9. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(9): 1649-1663
- [92] Ouyang X, Hong X, Zhao X Q, Zhang W, He X, Ma W Y, Teng W, Tong Y P. Knock out of the *PHOSPHATE2* gene *TaPHO2-A1* improves phosphorus uptake and grain yield under low phosphorus conditions in common wheat. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 29850
- [93] Ibrahim S, Saleem B, Rehman N, Zafar S A, Naeem M K, Khan M R. CRISPR/Cas9 mediated disruption of *Inositol Pentakisphosphate 2-Kinase 1* (*TaIPK1*) reduces phytic acid and improves iron and zinc accumulation in wheat grains. *Journal of Advanced Research*, 2022, 37: 33-41
- [94] Luo G B, Shen L S, Song Y H, Yu K, Ji J J, Zhang C, Yang W L, Li X, Sun J Z, Zhan K H, Cui D Q, Wang Y P, Gao C X, Liu D C, Zhang A M. The MYB family transcription factor *TuODORANT1* from *Triticum urartu* and the homolog *TaODORANT1* from *Triticum aestivum* inhibit seed storage

- protein synthesis in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(9): 1863-1877
- [95] Gao Y J, An K X, Guo W W, Chen Y M, Zhang R J, Zhang X, Chang S Y, Rossi V, Jin F M, Cao X Y, Xin M M, Peng H R, Hu Z R, Guo W L, Du J K, Ni Z F, Sun Q X, Yao Y Y. The endosperm-specific transcription factor *TaNAC019* regulates glutenin and starch accumulation and its elite allele improves wheat grain quality. *The Plant Cell*, 2021, 33(3): 603-622
- [96] Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna C V, Giménez M J, Sousa C, Voytas D F, Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(4): 902-910
- [97] Jouanin A, Gilissen L J W J, Schaart J G, Leigh F J, Cockram J, Wallington E J, Boyd L A, van den Broeck H C, van der Meer I M, America A H P, Visser R G F, Smulders M J M. CRISPR/Cas9 gene editing of gluten in wheat to reduce gluten content and exposure-reviewing methods to screen for coeliac safety. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 51
- [98] Camerlengo F, Frittelli A, Sparks C, Doherty A, Martignago D, Larré C, Lupi R, Sestili F, Masci S. CRISPR-Cas9 multiplex editing of the α -amylase/trypsin inhibitor genes to reduce allergen proteins in durum wheat. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2020, 4: 104
- [99] Raffan S, Sparks C, Huttly A, Hyde L, Martignago D, Mead A, Hanley S J, Wilkinson P A, Barker G, Edwards K J, Curtis T Y, Usher S, Kosik O, Halford N G. Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene *TaASN2*. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(8): 1602-1613
- [100] Okada A, Arndell T, Borisjuk N, Sharma N, Watson-Haigh N S, Tucker E J, Baumann U, Langridge P, Whitford R. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Ms1* enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(10): 1905-1913
- [101] Singh M, Kumar M, Albertsen M C, Young J K, Cigan A M. Concurrent modifications in the three homeologs of *Ms45* gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology*, 2018, 97(4-5): 371-383
- [102] Tang H L, Liu H Y, Zhou Y, Liu H W, Du L P, Wang K, Ye X G. Fertility recovery of wheat male sterility controlled by *Ms2* using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 19(2): 224-226
- [103] Liu C X, Zhong Y, Qi X L, Chen M, Liu Z K, Chen C, Tian X L, Li J L, Jiao Y Y, Wang D, Wang Y W, Li M R, Xin M M, Liu W X, Jin W W, Chen S J. Extension of the *in vivo* haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 316-318
- [104] Lv J, Yu K, Wei J, Gui H P, Liu C X, Liang D W, Wang Y L, Zhou H J, Carlin R, Rich R, Lu T C, Que Q D, Wang W C, Zhang X P, Kelliher T. Generation of paternal haploids in wheat by genome editing of the centromeric histone *CENH3*. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12): 1397-1401
- [105] Liang X N, Bie X M, Qiu Y L, Wang K, Yang Z J, Jia Y Q, Xu Z Y, Yu M, Du L P, Lin Z S, Ye X G. Development of powdery mildew resistant derivatives of wheat variety Fielder for use in genetic transformation. *The Crop Journal*, 2022, DOI: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221451412200160X>
- [106] 陈海强, 刘会云, 王轲, 张双喜, 叶兴国. 植物单倍体诱导技术发展与创新. *遗传*, 2020, 42(5): 466-482
- Chen H Q, Liu H Y, Wang K, Zhang S X, Ye X G. Development and innovation of haploid induction technologies in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2020, 42(5): 466-482
- [107] Kelliher T, Starr D, Su X J, Tang G Z, Chen Z Y, Carter J, Wittich P E, Dong S J, Green J, Burch E, McCuiston J, Gu W N, Sun Y J, Strebe T, Roberts J, Bate N J, Que Q D. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 287-292
- [108] Budhagatapalli N, Halbach T, Hiekel S, Büchner H, Müller A E, Kumlehn J. Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(12): 2376-2378